

Res'd PCT/PTO 30 NOV 2004
PCT/EP 03/06564 #2

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 11 JUL 2003	
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 33 542.7

Anmeldetag: 23. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Sartorius AG, Göttingen/DE

Bezeichnung: Membran, Filtrationsmodul und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit

IPC: B 01 D 61/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 31

5 **Membran, Filtrationsmodul und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit**

10 **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft eine Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit
15 befindlichen Molekülart.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Filtrationsmodul zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen mit chemisch aktivierten mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind.

Gelförmige kugelförmige Träger für Affinitätsliganden werden seit längerem in vielen Bereichen der Biotechnologie zur Reinigung und Abtrennung der verschiedensten Biomoleküle eingesetzt. Ein Beispiel dafür sind die Affinitätsträger auf Agarosebasis welche in Suspension in den Handel kommen. Das Suspensionsmedium kann dabei Wasser oder ein anderes Lösungsmittel sein. Nur wenige Matrices werden in lyophilisierter Form
30 angeboten.

Weiterhin ist es schwierig bis unmöglich einmal in wässrigem Medium gequollene Matrices wieder zu trocknen, da die Gelkugeln dabei irreversibel geschädigt werden. Die Aufbewahrung und der Transport solcher Gele stellen also ein erhebliches logistisches Problem dar.

Aus der EP 0 787 523 A1 ist bekannt, zur affinen Stofftrennung an ein Trägermaterial Liganden zu kuppeln, die die Funktion haben, eine einzelne Zielsubstanz oder auch eine ganze Klasse von Substanzen adsorptiv spezifisch zu binden.

Weiter ist aus der DE 196 17 775 A1 bekannt, Membranadsorber bzw. Membranen zu verwenden, die Liganden tragen, die zur Wechselwirkung mit mindestens einem Stoff einer mit ihm in Kontakt stehenden flüssigen Phase befähigt sind. Der Transport der flüssigen Phase durch die Membran hindurch erfolgt dabei konvektiv aufgrund einer Druckdifferenz.

Nachteilig bei der bekannten Abtrennung von Biomolekülen ist, dass die Träger bzw. Membranen mit den angekuppelten Affinitätsliganden aufwendig an einer Austrocknung gehindert werden müssen, um einen Verlust der Bioaktivität der Liganden zu vermeiden. Ein wassernasser Zustand der Membranen birgt zudem die Gefahr eines mikrobiellen Angriffes und bedingt die Notwendigkeit ein Konservierungsmittel zuzusetzen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Membranen zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Affinitätsliganden bereitzustellen, so dass deren umständliche und kostenintensive nasse Lagerung vermieden werden kann.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 1 dadurch gelöst, dass der Membrankörper mit dem Af-

finitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

5 Dadurch, dass der Membrankörper praktisch ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken lagerbar ist, können die Lager- und Transportkosten wesentlich verringert werden. Die Abtrennung der Biomoleküle vereinfacht sich.

10 Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Affinitätsliganden, wie Proteinen, beladene Membranen längere Zeit ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken gelagert werden können. Dabei handelt es sich um mikroporöse Membranen der Fa. Sartorius AG Göttingen, die unter dem Handelsnamen Sartobind[®] erhältlich sind. Unter „trocken“ soll dabei verstanden werden,
15 dass das Porenvolumen der Membran bzw. des Membrankörpers im wesentlichen durch Luft ausgefüllt ist. Dies schließt nicht aus, dass die innere Oberfläche von einer schwer flüchtigen organischen Substanz bedeckt ist.

20 Geeignet sind Membranen mit mikroporösen adsorptiven Membrankörpern auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat (CA), Cellulosenitrat (CN), Polyamid, PESU, PP, PVDF. Die Porengröße beträgt zwischen 0,01 bis 15 µm. Bevorzugt wird eine Porengröße zwischen 0,2 und 5 µm. Der Membrankörper weist weiterhin eine Dicke zwischen 100 und 500 µm, vorzugsweise von
25 200 bis 300 µm auf.

Die Membranen sind vorzugsweise chemisch aktiviert, so dass die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt werden. Es ist
30 aber auch eine physikalische Anbindung der Affinitätsliganden an die Membran möglich.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Membrankörper eine Imprägnierung mit Glycerin auf. Die
35 Glycerinimprägnierung trägt dazu bei, dass beim Trocknungs-

prozess die Struktur der mikroporösen Membran bzw. des Membrankörpers nicht beschädigt wird.

Mögliche Affinitätsliganden sind dem Fachmann bekannt. Als
5 Beispiele für adsorptive Liganden werden genannt:

- Thiophile,
- hydrophobe der verschiedenen Kettenlängen und Konfigurationen
- 10 - Reversed Phase,
- reaktive und andere Farbstoffe,
- niedermolekulare ungeladene oder geladene organische Moleküle,
- Aminosäuren und Analoga,
- 15 - Coenzyme, Cofaktoren und deren Analoga,
- Substrate und deren Analoga,
- endokrine und exokrine Substanzen wie Hormone und hormonähnlich wirkende Effektoren und deren Analoga,
- Enzym-Substrate, -Inhibitoren und deren Analoga,
- 20 - Fettsäuren, Fettsäurederivate, konjugierte Fettsäuren und deren Analoga.
- Nukleinsäuren
- DNA, und deren Analoga und Derivate,
- RNA und deren Analoga und Derivate,
- 25 - Monomere und deren Analoga und Derivate,
- Oligo- bis Polymere und deren Analoga und Derivate,
- hochmolekulare Kohlenhydrate linear oder verzweigt; unsubstituiert oder substituiert,
- Glycokonjugate, wie
- 30 - Heparin,
- Amylose, Zellulose,
- Chitin, Chitosan,
- Monomere und Oligomere,
- deren aller Derivate und Analoga,
- 35 - Lignin und dessen Derivate und Analoga.

- Hochmolekulare Liganden wie
 - Proteine und ihre Oligomere, Multimere, Untereinheiten, sowie Teile davon,
 - Peptide, Polypeptide deren Analoga und Derivate,
 - 5 - Lectine,
 - Antikörper und Teile davon,
 - Fusionsproteine,
 - Haptene,
 - Enzyme und Untereinheiten sowie Teile davon,
 - 10 - Strukturproteine,
 - Rezeptoren und Effektoren sowie Teile davon,
 - Xenobiotika
 - Pharmazeutika und Pharmazeutische Wirkstoffe
 - Alkaloide
 - 15 - Antibiotika
 - Biomimetika

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtungen bzw. ein Filtrationsmodul anzugeben, dass zur kostengünstigen und
 20 effektiven Abtrennung von Biomolekülen geeignet ist.

Diese weitere Aufgabe wird erfindungsgemäß in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 9 dadurch gelöst, dass die Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8 ausgebildet ist.

25

Durch die Ausbildung der Membrane nach einem der Ansprüche 1 bis 8 weist das Filtrationsmodul die oben genannten Vorteile auf.

30 Insbesondere kann durch die Verwendung einer Mehrzahl von Membranen eine selektive Trennung verschiedener Biomoleküle erreicht werden. Die Membranen können zudem dem jeweiligen Trennproblem relativ einfach angepasst werden. Die Membranen können mehrlagig in einem Gehäuse angeordnet werden. Sie kön-

nen aber auch hintereinander in unterschiedlichen Gehäusen oder Gehäusekammern angeordnet werden

Die bekannten Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen weisen die oben genannten Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes und kostengünstiges Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer zu prozessierenden Flüssigkeit anzugeben, das auf eine umständliche nasse Lagerung und Transport verzichten kann.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 12 dadurch gelöst, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

- a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper,
- b) Spülen des Membrankörpers mit mindestens einem Spülmedium,
- c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
- d) trockene Zwischenlagerung der Membranen bei Bedarf und
- e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen, so dass die Biomoleküle abgetrennt werden.

Durch die mögliche trockene Lagerung der Membran ohne Aktivitätsverlust wird sowohl die Lagerung als auch der Transport vereinfacht und damit kostengünstiger.

Um die Gefahr eines mikrobiellen Angriffs bei Verwendung von Wasser als Spülmedium weitgehend auszuschließen, wird die Membran vorzugsweise auf eine Wasseraktivität von $\leq 40\%$ getrocknet. Unter Wasseraktivität ist dabei der Gleichgewichtspartialdruck des Wassers bezogen auf reines Wasser der gleichen Temperatur zu verstehen.

Dem letzten Spülmedium nach Schritt b) kann noch in einem Schritt b1) eine schwer flüchtige, mit dem Spülmedium mischbare, organische Substanz bzw. Komponente als Imprägnierungsmittel zugefügt werden. Das Imprägnierungsmittel verbleibt bei dem Trocknungsvorgang in der Membrane. Es kann auf der Porenoberfläche einen Film bilden oder die Membranismatrix in einem gequollenen Zustand erhalten.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielhaft veranschaulicht sind.

Figur 1: Eine schematische Darstellung eines Filtermoduls mit einer in einem Gehäuse angeordneten Membran,

Figur 2: eine schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in Gehäusen hintereinander geschalteten Membran und

Figur 3: eine Schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in einem Gehäuse mehrlagig angeordneten Membranen.

Ein Filtermodul 1 zum Abtrennen von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit besteht im Wesentlichen aus einem Gehäuse 2 und einer Membran 3 mit einem Membrankörper 4.

Das Gehäuse 2 weist einen Zufluss 5 und einen Abfluss 6 auf. Die Membran 3 mit ihrem mikroporösen adsorbativen Membrankörper 4 ist auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Polyamid, PESU, PP, PVDF ausgebildet und weist eine Porengröße zwischen 0,01 bis 15 μm , vorzugsweise 0,2 bis 5 μm auf. Der flächig ausgebildete Membrankörper 4 weist dabei eine Dicke zwischen 100 und 500 μm , vorzugsweise 200 bis

300 µm auf. An den Membrankörper 4 sind dem Fachmann bekannte (nicht dargestellte) Affinitätsliganden gekuppelt. Die Affinitätsliganden werden so ausgesucht, dass sie zu einer Wechselwirkung mit dem aus der zu prozessierenden Flüssigkeit abzutrennenden Biomolekül befähigt sind.

Die Membran 3 kann entsprechend Fig. 1 einlagig in dem Gehäuse 2 angeordnet sein. Mehrere Gehäuse 2 mit Membranen 3 können dabei hintereinander angeordnet werden.

Des ist aber auch möglich, die Membranen 3' mehrlagig in einem Gehäuse 2' anzuordnen. An die Membran 3, 3' wird der nicht dargestellte Affinitätsligand chemisch angekuppelt, die Membran 3, 3' mit Glycerin imprägniert und anschließend einem Trocknungsprozess unterzogen. Dabei wird der Membran 3, 3' weitgehend das Wasser entzogen. Nach einer Trockenlagerung bzw. nach einem Transport wird der Membran 3, 3' über den Zufluss 5 die zu prozessierende Flüssigkeit zugeführt und konvektiv durch die Membran transportiert, so dass sie über den Abfluss 6 abfließen kann. Die abzutrennenden Biomoleküle werden dabei an die Affinitätsliganden angebunden.

Beispiel:

Die nachfolgend mit PBS bezeichnete Lösung wurde, wie in J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis „Molecular Cloning“ A Laboratory Manual, second edition Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, Book 3, Appendix B.12 beschrieben, wie folgt hergestellt:

g/l	Substanz
8,0	Natriumchlorid NaCl
0,20	Kaliumchlorid KCl
1,44	di-Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4
0,24	Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4
pH 7,4 \pm 0,2	

Eine mit Aldehydgruppen funktionalisierte mikroporöse Membrane des Typs Sartobind® Aldehyde Membrane code 19306 wurde mit Protein A umgesetzt. Dazu wurde Protein A der Fa. Repligen, Bezeichnung rPrA Lot Nr. 011038 zu 10 mg/ml in PBS gelöst. Drei Filterronden mit 25 mm Durchmesser wurden mit 2 ml dieser Lösung in einer kleinen Plastikpetrischale für 3 h bei Umgebungstemperatur geschüttelt. Zur Reduktion der entstandenen Schiffschen Basen wurde 1% Endkonzentration Cyano-
borhydrid zugesetzt. Nach Ablauf der Umsetzung wurden die Membranen entnommen und in eine frische Petrischale überführt. Zur Reduktion der restlichen Aldehydgruppen wurden 5 ml einer Lösung von Natrium-Borhydrid in PBS mit einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und die Membranen für weitere 15 min geschüttelt. Die Membranen wurden danach nacheinander mit PBS, einer Lösung von 0.1 M Glyzin pH 2,7, 1 mM HCl, 1 mM NaOH und 1 M NaCl in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 gespült. Die Membranen wurden mit einer Lösung von 22% w/v Glycerol in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 imprägniert. Die Membranen wurden dann bei Umgebungstemperatur in einem Luftstrom für 3 h getrocknet und bei 4°C unter weitgehendem Luftabschluss gelagert.

Nach bestimmten Zeiten wurden Membranen entnommen und auf ihre Bindungskapazität für humane Immunglobuline des Typs IgG1 und IgG2 getestet.

5 Dabei wurden drei der oben beschriebenen Membranen mit 25 mm Durchmesser in ein Spritzenvorsatz Best. Nr. 16517 der Fa. Sartorius AG eingebaut und mit einer Einwegspritze versehen. Humanes abgelaufenes Plasma einer örtlichen Blutbank wurde 1:40 mit PBS verdünnt und diese Lösung über 0.2 µm membran-
10 filtrierte. 10 ml dieser so erhaltenen Lösung wurde in die Spritze gefüllt und durch Schwerkraft über die drei eingebauten Membranen filtrierte. Dann wurde mit 10 ml PBS gespült und die gebundene Menge IgG durch 10 ml 0.1 M Glyzin pH 2.7 eluiert. Die Absorption der Elutionslösung bei 280 nm wurde in
15 einem Spektralphotometer bestimmt und an Hand einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin als Vergleichssubstanz die Proteinbindekapazität der Membrane bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tabelle
20 dargestellt.

Tabelle: Zeitliche Veränderung der IgG Bindekapazität von Protein A beladenen aldehyd-funktionalisierten Membranen

Zeit (Tage)	Bindekapazität (µg/cm ²)
0	42
1	41
4	47
20	43
45	40
56	37

25

Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Messungen.

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 31

5 Patentansprüche

1. Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit
10 mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') mit dem Affinitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.
- 15 2. Membran nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') chemisch aktiviert und die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt sind.
3. Membran nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**,
20 dass der Affinitätsligand ein bioaktives Molekül ist, dessen Spezifität und / oder Kapazität im getrockneten Zustand des Membrankörpers (4, 4') im Wesentlichen erhalten bleibt.
4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,01 bis 15 µm aufweist.
5. Membran nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der
30 Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,2 bis 5 µm aufweist.
6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 100 bis 500 µm aufweist.

7. Membran nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 200 bis 300 µm aufweist.

5 8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass dem Membrankörper (4, 4') nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang weitgehend Wasser entzogen wurde.

10 9. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Glycerinimprägung aufweist.

15 10. Filtrationsmodul zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membran (3, 3', 3'') nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet ist.

20 11. Filtrationsmodul nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3'') mehrlagig in dem Gehäuse (2'') angeordnet ist.

25 12. Filtrationsmodul nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3') in Gehäusen (2') hintereinander angeordnet sind.

30 13. Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen mit mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper (4, 4'),

- b) Spülen des Membrankörpers (4, 4') mit mindestens einem Spülmedium,
- c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
- 5 d) trockene Zwischenlagerung der Membranen (3, 3', 3'') bei Bedarf und
- e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen (3, 3', 3''), so dass die Biomoleküle abgetrennt werden.

10 14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Anschluss an Schritt b) der folgende Schritt eingefügt wird:

- b1) Zusetzen einer schwer flüchtigen mit dem Spülmedium mischbaren organischen Komponente in das Spülmedium zum
15 Ende der Spülung nach Schritt b).

15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass Glycerin als schwer flüchtige organische Komponente zugesetzt wird.

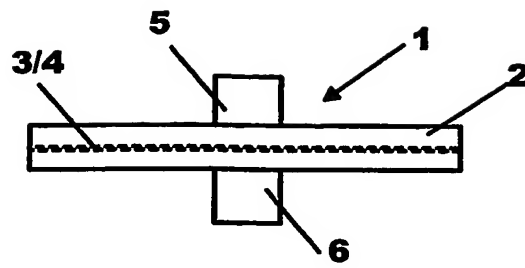


Fig. 1

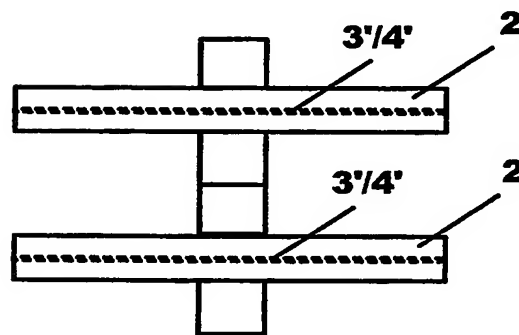


Fig. 2

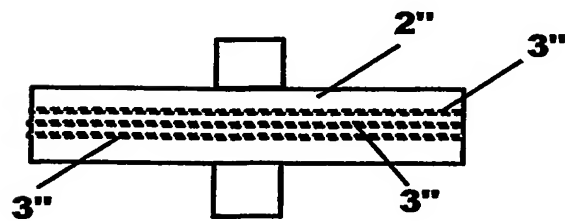


Fig. 3

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 31

Zusammenfassung

Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, wobei der Membrankörper unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

Filtrationsmodul und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen mit mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, wobei dem Membrankörper nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang unter Beibehaltung der Aktivität weitgehend Wasser entzogen wird, wobei bei Bedarf die Membranen trocken zwischengelagert werden, und wobei anschließend die Flüssigkeit durch die Membranen filtriert und die Biomoleküle abgetrennt werden.